

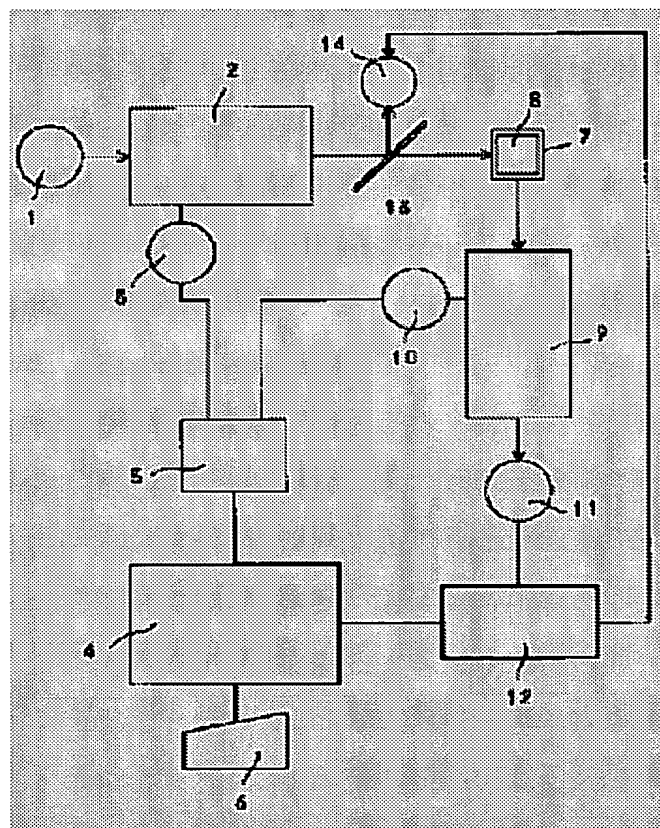
# CORRECTING METHOD FOR SPECTRUM OF FLUORESCENCE SPECTROPHOTOMETER AND FLUORESCENCE SPECTROPHOTOMETER WITH SPECTRUM CORRECTING FUNCTION

**Patent number:** JP5072039  
**Publication date:** 1993-03-23  
**Inventor:** KOSHI HIROYUKI; OWADA MINORU  
**Applicant:** HITACHI LTD  
**Classification:**  
 - international: G01J3/443; G01N21/64  
 - european:  
**Application number:** JP19910234705 19910913  
**Priority number(s):** JP19910234705 19910913

Report a data error here

## Abstract of JP5072039

**PURPOSE:** To make it possible to perform highly accurate spectrum correction in a broad measuring range by utilizing an existing reference light source or sub-reference light source used for the wavelength-characteristic measurement on the fluorescence side, and obtaining the wavelength characteristic on the exciting side. **CONSTITUTION:** An optical quantum meter wherein rhodamine B is contained is set at the position of a sample cell 7. A fluorescence wavelength is set, and a spectroscope 2 on the exciting side undergoes wavelength scanning. The exciting-side wavelength characteristic in a wavelength region  $\lambda_1$  (e.g. 200-600nm) is measured. The light from a sub-reference light source is made incident on a fluorescence-side spectroscope 9. The fluorescence-side wavelength characteristic in a wavelength region  $\lambda_2$  (e.g. 500-900nm) is measured. Then, a diffusing element is set at the position of the cell 7. Both wavelengths on the exciting side and the fluorescence side are scanned at the same time for the whole wavelength region (200-900nm). The spectrum value, which is the product of both wavelengths is measured. The spectrum value and both wavelength characteristics are utilized, and the spectrum correcting functions for the fluorescence-side wavelength characteristic in the region  $\lambda_1$ , the exciting-side wavelength characteristic in the region  $\lambda_2$  and the whole wavelength region are obtained. The functions are used for the true spectrum measurement and computation of an unknown sample.



Data supplied from the [esp@cenet](mailto:esp@cenet) database - Worldwide

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-72039

(43)公開日 平成5年(1993)3月23日

(51)Int.Cl.<sup>3</sup>

G 0 1 J 3/443

G 0 1 N 21/64

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

8707-2G

Z 9115-2J

審査請求 未請求 請求項の数6(全10頁)

(21)出願番号 特願平3-234705

(22)出願日 平成3年(1991)9月13日

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 越 裕之

茨城県勝田市市毛882番地 株式会社日立

製作所那珂工場内

(72)発明者 大和田 実

茨城県勝田市市毛882番地 株式会社日立

製作所那珂工場内

(74)代理人 弁理士 高橋 明夫 (外1名)

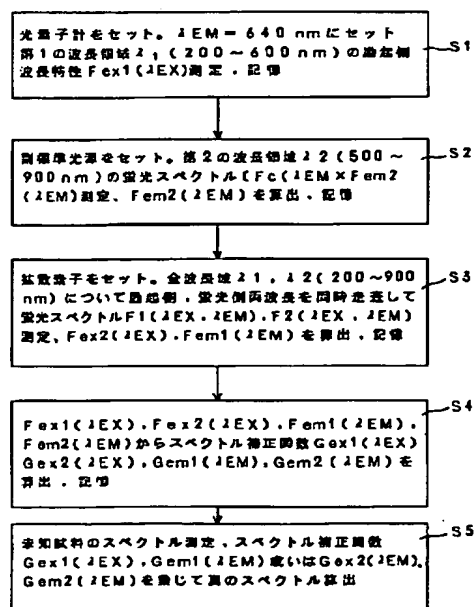
(54)【発明の名称】 分光蛍光光度計のスペクトル補正方法及びスペクトル補正機能付分光蛍光光度計

(57)【要約】

【目的】 分光蛍光光度計の波長特性を励起側についても蛍光側と同様に広げてスペクトル補正については測定レンジを高精度に広げる。

【構成】 S1で波長領域 $\lambda_1$  (200~600nm)の励起側波長特性 $F_{ex1}(\lambda EX)$ を光量子計を用いて求める。S2で標準光源又は副標準光源を用いて波長領域 $\lambda_2$  (500~900nm)の蛍光側波長特性 $F_{em2}(\lambda EM)$ を求める。S3で光学系の全波長領域 $\lambda_1, \lambda_2$ について励起側、蛍光側の波長を一致させつつ走査する。得られたスペクトルは、励起側、蛍光側両方の波長特性の積となり、このスペクトル値と既知の $F_{ex1}(\lambda EX), F_{em2}(\lambda EM)$ とを比演算して、 $\lambda_1$ の蛍光側波長特性 $F_{em1}(\lambda EM)$ と $\lambda_2$ の励起側波長特性 $F_{ex2}(\lambda EX)$ が求まり、これらの波長特性から $\lambda_1, \lambda_2$ の励起側、蛍光側の補正関数が求まる。

図 1



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 光源、励起側分光器、蛍光側分光器、蛍光検知器、蛍光信号値（蛍光スペクトル値）から測定結果を算出する演算器を備えた分光蛍光光度計のスペクトル補正を行う場合に、所定の波長領域の蛍光側光学系の波長特性を標準光源又は標準光源により校正された光源（副標準光源）を利用して求め、且つ前記所定の波長領域について前記励起側分光器、蛍光側分光器により励起側、蛍光側の両波長を一致させながら同時走査して蛍光スペクトルを測定し、この測定された蛍光スペクトル値と前記標準光源又は副標準光源を利用して求めた前記蛍光側光学系の波長特性との比演算により前記所定の波長領域における励起側光学系の波長特性を算出し、この励起側光学系の波長特性及び前記蛍光側光学系の波長特性に基づきスペクトル補正関数を定めることを特徴とする分光蛍光光度計のスペクトル補正方法。

【請求項2】 請求項1において、前記標準光源又は副標準光源としてタングステンランプを用い、前記所定の波長領域は600nmより長波長側の領域を含み、前記励起側、蛍光側の両波長を一致させながらの同時走査による蛍光スペクトル測定には光拡散素子を光路上にセットして行うことを特徴とする分光蛍光光度計のスペクトル補正方法。

【請求項3】 光源、励起側分光器、蛍光側分光器、蛍光検知器、蛍光信号値（蛍光スペクトル値）から測定結果を算出する演算器を備えた分光蛍光光度計のスペクトル補正を行う場合に、測定範囲の波長領域 $\lambda$ を第1波長領域 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ に分け（ $\lambda_1 < \lambda_2$ ）、第1の波長領域 $\lambda_1$ の励起側光学系の波長特性 $F_{ex1}(\lambda EX)$ を量子計法により求める工程イ、第2の波長領域 $\lambda_2$ の蛍光側光学系の波長特性 $F_{em2}(\lambda EM)$ を標準光源又は標準光源により校正された光源（副標準光源）を利用して求める工程ロ、第1の波長領域 $\lambda_1$ 及び第2の波長領域 $\lambda_2$ の全波長領域について前記励起側分光器、蛍光側分光器により励起側、蛍光側の両波長を一致させながら同時走査して蛍光スペクトルを測定する工程ハ、前記工程ハで測定された蛍光スペクトル値のうち第1の波長領域 $\lambda_1$ に対応の測定値 $F_1(\lambda EX, \lambda EM)$ 、第2の波長領域 $\lambda_2$ に対応の測定値 $F_2(\lambda EX, \lambda EM)$ を分けて、測定値 $F_1(\lambda EX, \lambda EM)$ と前記工程イで求めた波長特性 $F_{ex1}(\lambda EX)$ との比演算より第1の波長領域 $\lambda_1$ の蛍光側光学系の波長特性 $F_{em1}(\lambda EM)$ を求め、一方、測定値 $F_2(\lambda EX, \lambda EM)$ と前記工程ロで求めた波長特性 $F_{em2}(\lambda EM)$ との比演算により第2の波長領域 $\lambda_2$ の励起側光学系の波長特性 $F_{ex2}(\lambda EX)$ とを求める工程ニ、前記イ〜ニの工程により求まる各波長特性より第1、第2の波長領域 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ ごとの励起側、蛍光側各々のスペクトル補正関数 $G_{ex1}(\lambda EX)$ 、 $G_{em1}(\lambda E$

$M)$ と $G_{ex2}(\lambda EX)$ 、 $G_{em2}(\lambda EM)$ を求めることを特徴とする分光蛍光光度計のスペクトル補正方法。

【請求項4】 請求項3において、前記工程イの量子計の蛍光スクリーンとしてローダミンBを用い、前記工程ロの標準光源又は副標準光源としてタングステンランプを用い、前記第1の波長領域は600nm以下で200nm以上の範囲の中から設定し、前記第2の波長領域は、前記第1の波長領域以上で900nm以下の範囲を含む（第1、第2の領域が一部重複してもよい）ように設定したことを特徴とする分光蛍光光度計のスペクトル補正方法。

【請求項5】 請求項3又は請求項4において、前記工程ハでは光拡散素子を光路上にセットしてスペクトル測定を行うことを特徴とする分光蛍光光度計のスペクトル補正方法。

【請求項6】 光源、励起側分光器、蛍光側分光器、蛍光検知器、蛍光信号値（蛍光スペクトル値）から測定結果を算出する演算器を備えた分光蛍光光度計において、励起側光学系及び蛍光側光学系の波長特性に影響される見かけの蛍光スペクトル値を補正する手段を有し、このスペクトル補正手段は、測定範囲の波長領域 $\lambda$ を第1波長領域 $\lambda_1$ と第2の波長領域 $\lambda_2$ とに分けて（ $\lambda_1 < \lambda_2$ ）、これらの波長領域 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ ごとに次の関係式で予め求めた補正関数 $G_{ex1}(\lambda EX)$ 、 $G_{em1}(\lambda EM)$ と $G_{ex2}(\lambda EX)$ 、 $G_{em2}(\lambda EM)$ を記憶し、

【数1】・ $\lambda_1$ について  $F_{ex1}(\lambda EX) \times F_{em1}(\lambda EM) = F_1(\lambda EX, \lambda EM)$

・ $\lambda_2$ について  $F_{ex2}(\lambda EX) \times F_{em2}(\lambda EM) = F_2(\lambda EX, \lambda EM)$

ここで、 $F_{ex1}(\lambda EX)$ ：量子計法により求めた第1の波長領域 $\lambda_1$ の励起側光学系の波長特性

$F_1(\lambda EX, \lambda EM)$ ：第1の波長領域 $\lambda_1$ において励起側波長と蛍光側波長を一致させつつ励起側分光器及び蛍光側分光器を同時に波長走査して得られたスペクトル測定値

$F_{em1}(\lambda EM)$ ： $F_1(\lambda EX, \lambda EM)$ と $F_{ex1}(\lambda EX, \lambda EM)$ との比演算より得た第1の波長領域 $\lambda_1$ の蛍光側光学系の波長特性

$F_{em2}(\lambda EX)$ ：標準光源又は標準光源により校正された光源（副標準光源）を用いて求めた第2の波長領域 $\lambda_2$ の蛍光側光学系の波長特性

$F_2(\lambda EX, \lambda EM)$ ：第2の波長領域 $\lambda_2$ において励起側波長と蛍光側波長を一致させつつ励起側分光器及び蛍光側分光器を同時に波長走査して得られたスペクトル測定値

$F_{ex2}(\lambda EM)$ ： $F_2(\lambda EX, \lambda EM)$ と $F_{em2}(\lambda EX, \lambda EM)$ との比演算より得た第2波長領域 $\lambda_2$ の励起側光学系の波長特性

・ $\lambda 1$ について、

$$G_{ex1}(\lambda EX) = F_{ex1}(\lambda A) / F_{ex1}(\lambda EX)$$

$$G_{em1}(\lambda EM) = F_{em1}(\lambda A) / F_{em1}(\lambda EM)$$

・ $\lambda 2$ について

$$G_{ex2}(\lambda EX) = F_{ex2}(\lambda A) / F_{ex2}(\lambda EX)$$

$$G_{em2}(\lambda EM) = F_{em2}(\lambda A) / F_{em2}(\lambda EM)$$

ここで、 $G_{ex1}(\lambda EX)$ ： $\lambda 1$ の励起側光学系の補正スペクトル関数

$G_{em1}(\lambda EM)$ ： $\lambda 1$ の蛍光側光学系の補正スペクトル関数

$G_{ex2}(\lambda EX)$ ： $\lambda 2$ の励起側光学系の補正スペクトル関数

$G_{em2}(\lambda EM)$ ： $\lambda 2$ の蛍光側光学系の補正スペクトル関数

$\lambda A$ ：スペクトルの相対的形狀を補正するために、見かけのスペクトル値のうちの一つを基準として適当に選んだもの

前記記憶した $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ のいずれかの補正スペクトル関数を実測される蛍光スペクトル値の測定波長領域 $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ に応じて読み出して見かけのスペクトル値の補正演算を行うよう設定したことを特徴とするスペクトル補正機能付き分光蛍光光度計。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は試料固有のスペクトル測定に用いる分光蛍光光度計に係り、特にそのスペクトル補正の技術に関する。

【0002】

【従来の技術】分光蛍光光度計は、光源から放射される光線が励起側分光器にて波長設定され、その波長設定された単色光が試料セル内の測定試料を照射、励起し、試料から発光した蛍光を蛍光側分光器及び蛍光検知器を介して検出して、蛍光（励起・発光）スペクトルを測定する。

【0003】蛍光スペクトルは、励起光の強度 $I_{ex}(\lambda)$ と蛍光分子の吸光係数 $\epsilon_{ex}(\lambda)$ との積に比例するため、どの波長に設定しても一定の励起光強度が得られるような理想的な測定系で蛍光スペクトルを観察するのが望ましい。しかし、実際の測定系では励起光強度 $I_{ex}(\lambda)$ は波長とともに変動し、その変動は光源や分光器の種類、装置の経年変化等いわゆる装置の個性に大きく依存する。このことは、励起側だけでなく、蛍光側においてもその分光器や検知器の感度特性等に個性があるため同様のことがいえる。従って、検知器に表れる蛍光スペクトルは見かけ上のものとなる。真のスペクトルを求めるには、上記の装置の個性（装置関数、波長特性ともいう）を考慮したスペクトル補正を行うことが必要となる。

【0004】この種のスペクトル補正の従来技術としては、例えば特開平2-259533号公報等に開示され

るようにフォトダイオードを用いてスペクトル補正を行うもの等種々提案されているが、従来より最も高感度で信頼できるスペクトル補正技術として評価されているものに、木下、御橋編「蛍光測定」（学会出版センター）2章、4「見かけ」の蛍光スペクトルと「真」の蛍光スペクトル（63頁から70頁）において論じられているように、励起側については光量子計法、蛍光側については、光量子計法と標準光源を用いる方法を併用したものがある。

【0005】ここで、上記文献に記載されたスペクトル補正について説明する。

【0006】〔励起側の補正〕励起側の補正に用いる光量子計法は、高濃度のローダミンBの溶液が600nmまでの波長域において十分に高い吸光度を示す性質を利用する。実際には、ローダミンB溶液を三角セルに入れ試料ホルダーにセットし、蛍光側の分光器の波長を615nmより長波長側に設定し（発光の内部遮蔽効果の影響を抑えるためである）、励起側分光器の波長を走査して光検出器からの信号を記録し励起光強度の波長特性を求め、これに基づき一定の励起光強度に相当する補正を行う。

【0007】〔蛍光側の補正〕蛍光側の補正では、前記光量子計法と標準光源を用いる方法が併用される。標準光源を用いる方法は、黒体輻射を基準にして分光出力特性が正確に求められている標準タングステンランプ若しくはこのランプをもとに校正された二次標準ランプ（副標準光源）を用い、ランプの放射光を蛍光側分光器で波長走査しつつ検知することで、蛍光側の波長特性を求める。この標準光源方法は600nmより長波長側の領域の蛍光側の波長特性を知る上で現在のところ信頼できる唯一の方法とされている。

【0008】そして、600nm以下の領域はローダミンB溶液を用いた光量子計法でカバーしている。すなわち、まず上記の励起側で用いたローダミンBの要領で励起光の分光特性 $I_{ex}(\lambda)$ を求める。次に試料ホルダー位置に光拡散素子をセットして、励起光を導きつつ励起側と蛍光側の分光器を同じ波長で走査して検出器の出力 $H(\lambda i)$ を計る。この $H(\lambda i)$ と $I_{ex}(\lambda)$ の比から600nm以下の蛍光側の波長特性が求まる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】上記従来技術では、蛍光側については、ローダミンBを用いた光量子計法と標準光源を用いる方法との併用により、通常の分光蛍光光度計の測定波長域（200～900nm）に対する光度

5

計の波長特性を求めることができるが、励起側については、ローダミンBを用いた光量子計法以外、信頼できる有効な方法がないため、200～600nmの範囲外については波長特性を求めることができない。従って、装置全体としてみれば、600nm以上の波長域で十分なスペクトル補正を伴いつつ試料分析を行うことができない。

【0010】本発明は以上の点に鑑みてなされ、その目的は、分光蛍光光度計において、前述したような励起側についても蛍光側と同様に例えば600nm以上の波長特性を高精度に、しかも蛍光側の波長特性測定に用いた既存の標準光源又は副標準光源を利用して求め、測定対象波長については試料の測定レンジを広げることができるスペクトル補正技術を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は上記目的を達成するために、基本的には次のようなスペクトル補正技術を提案する。

【0012】すなわち、光源、励起側分光器、蛍光側分光器、蛍光検知器、蛍光信号値（蛍光スペクトル値）から測定結果を算出する演算器を備えた分光蛍光光度計のスペクトル補正を行う場合に、所定の波長領域（例えば600nm以上或いはその近くの値以上の波長領域）の蛍光側光学系の波長特性を標準光源又は副標準光源を利用して求め、且つ前記所定の波長領域について前記励起側分光器、蛍光側分光器により励起側、蛍光側の両波長を一致させながら同時走査して蛍光スペクトルを測定し、この測定された蛍光スペクトル値と前記標準光源

（又は副標準光源）を利用して求めた前記蛍光側光学系の波長特性との比演算により前記所定の波長領域における励起側光学系の波長特性を算出し、以上のようにして求まる励起側光学系の波長特性及び蛍光側波長特性に基づきスペクトル補正関数を定める（これを第1の課題解決手段とする）。

【0013】さらに、その応用として、上記の第1の課題解決手段に加えて、光量子計法を併用して上記の所定の領域以外の波長域（例えば600nm以下の波長域）についての波長特性を求める手段を提案する。

【0014】すなわち、上記のような分光蛍光光度計のスペクトル補正を行う場合に、まず、測定範囲の波長領域 $\lambda$ を第1、第2の波長領域 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ に分けておく

（ $\lambda_1 < \lambda_2$ ）。ここで、領域 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ は適宜任意に選択され、例えば後述の実施例では $\lambda_1$ が200～500nm、 $\lambda_2$ が500～900nmとしてある。そして、上記の領域 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ を前提として、第1の波長領域 $\lambda_1$ の励起側光学系の波長特性 $F_{ex1}(\lambda EX)$ を光量子計法により求める工程イ、第2の波長領域 $\lambda_2$ の\*

$$F_{ex}(\lambda EX) \times F_{em}(\lambda EM) = F(\lambda EX, \lambda EM)$$

すなわち、 $F_{em}(\lambda EM)$  及び  $F(\lambda EX, \lambda EM)$  が既知であることから、上記式を成立させることで、波

6

\* 蛍光側光学系の波長特性 $F_{em2}(\lambda EM)$  を標準光源又は副標準光源を利用して求める工程ロ、第1の波長領域 $\lambda_1$ 及び第2の波長領域 $\lambda_2$ の全波長領域について前記励起側分光器、蛍光側分光器により励起側、蛍光側の両波長を一致させながら同時走査して蛍光スペクトルを測定する工程ハ、前記工程ハで測定された蛍光スペクトル値のうち第1の波長領域 $\lambda_1$ に対応の測定値 $F_1(\lambda EX, \lambda EM)$ 、第2の波長領域 $\lambda_2$ に対応の測定値 $F_2(\lambda EX, \lambda EM)$  を分けて、測定値 $F_1(\lambda EX, \lambda EM)$  と前記工程イで求めた波長特性 $F_{ex1}(\lambda EX)$  との比演算より第1の波長領域 $\lambda_1$ の蛍光側光学系の波長特性 $F_{em1}(\lambda EM)$  を求め、一方、測定値 $F_2(\lambda EX, \lambda EM)$  と前記工程ロで求めた波長特性 $F_{em2}(\lambda EM)$  との比演算により第2の波長領域 $\lambda_2$ の励起側光学系の波長特性 $F_{ex2}(\lambda EX)$  とを求める工程ニ、前記イ～ニの工程により求まる各波長特性より第1、第2の波長領域 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ ごとの励起側、蛍光側各々のスペクトル補正関数 $G_{ex1}(\lambda EX)$ 、 $G_{em1}(\lambda EM)$  と  $G_{ex2}(\lambda EX)$ 、 $G_{em2}(\lambda EM)$  を求める（これを第2の課題解決手段とする）。

【0015】さらにその応用として、上記第2の課題解決手段のようにして求めた各波長領域 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ ごとの補正関数、すなわち $G_{ex1}(\lambda EX)$ 、 $G_{em1}(\lambda EM)$  と  $G_{ex2}(\lambda EX)$ 、 $G_{em2}(\lambda EM)$  を記憶し、実測される蛍光スペクトル値の所属する波長領域 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ に応じて上記補正関数 $G_{ex1}(\lambda EX)$ 、 $G_{em1}(\lambda EM)$  或いは  $G_{ex2}(\lambda EX)$ 、 $G_{em2}(\lambda EM)$  のいずれかを読み出して見かけのスペクトル値の補正演算を行う手段を備えたスペクトル補正機能付きの分光蛍光光度計を提案する（これを第3の課題解決手段とする）。

【0016】

【作用】第1の課題解決手段の作用…標準光源又は副標準光源から放射される光を蛍光側光学系の分光器で所定の波長領域 $\lambda$ で走査しつつ蛍光検知器で測定すると、結果は、標準光源（副標準光源）の波長特性 $F_c(\lambda EM)$  と蛍光側光学系の波長特性 $F_{em}(\lambda EM)$  との積となり、 $F_c(\lambda EM)$  が既知であることから比演算により $F_{em}(\lambda EM)$  が求まる。また、前記所定の波長領域 $\lambda$ について励起側、蛍光側の両波長を一致させながら同時走査して得た蛍光スペクトル値を $F(\lambda EX, \lambda EM)$  とする。この蛍光スペクトル値 $F(\lambda EX, \lambda EM)$  には、蛍光側光学系の波長特性 $F_{em}(\lambda EM)$  のほかに励起側光学系の波長特性 $F_{ex}(\lambda EX)$  が含まれ、これを式で表せば、次式で表される。

【0017】

【数2】

長領域 $\lambda$ における励起側波長特性 $F_{ex}(\lambda EX)$  を  $F(\lambda EX, \lambda EM)$  と  $F_{em}(\lambda EM)$  との比演算によ

り算出できる。そして、このような600nm以上で信頼できる標準光源又は副標準光源を用いる方法及び数2式を用いることで、従来、光量子計法では測定できなかった600nm以上の励起側光学系の波長特性を知り、ひいてはこの600nm以上の励起側波長特性と蛍光側波長特性に基づき励起側、蛍光側の双方の補正関数 $G_{ex}(\lambda EX)$ 、 $G_{em}(\lambda EM)$ を求めることができる(通常、補正関数は波長特性の逆数で表される)。

【0018】第2の課題解決手段の作用…工程イ〜ハで求めた、第1の波長領域 $\lambda 1$ の励起側波長特性 $F_{ex1}(\lambda EX)$ 、第2の波長領域 $\lambda 2$ の蛍光側波長特性 $F_{em2}(\lambda EM)$ 、測定対象の全波長領域 $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ の蛍光スペクトル値 $F1(\lambda EX, \lambda EM)$ 、 $F2(\lambda EX, \lambda EM)$ は全て既存の信頼性の高い方法を用いて求めることができる。

【0019】上記の既知の実測データ $F_{ex1}(\lambda EX)$ 、 $F_{em2}(\lambda EM)$ 、 $(\lambda EX, \lambda EM)$ 、 $F2(\lambda EX, \lambda EM)$ と、未知たる第1の波長領域 $\lambda 1$ の蛍光側波長特性 $F_{em1}(\lambda EM)$ 及び第2の波長領域 $\lambda 2$ の励起側波長特性 $F_{ex2}(\lambda EX)$ とには次式が

$$\begin{aligned} G_{ex1}(\lambda EX) &= F_{ex1}(\lambda A) / F_{ex1}(\lambda EX) \\ G_{em1}(\lambda EM) &= F_{em1}(\lambda A) / F_{em1}(\lambda EM) \end{aligned}$$

・ $\lambda 2$ について

$$\begin{aligned} G_{ex2}(\lambda EX) &= F_{ex2}(\lambda A) / F_{ex2}(\lambda EX) \\ G_{em2}(\lambda EM) &= F_{em2}(\lambda A) / F_{em2}(\lambda EM) \end{aligned}$$

$\lambda A$ : スペクトルの相対的形狀を補正するために、見かけのスペクトル値のうちの一つを基準として適当に選んだものなお、この第2の課題解決手段において述べた要素のうち、 $\lambda 2$ 、 $F_{ex2}(\lambda EX)$ 、 $F_{em2}(\lambda EM)$ 、 $G_{ex2}(\lambda EX)$ 、 $G_{em2}(\lambda EX)$ のそれぞれが第1の課題解決手段で述べた $\lambda$ 、 $F_{ex}(\lambda EX)$ 、 $F_{em}(\lambda EM)$ 、 $G_{ex}(\lambda EX)$ 、 $G_{em}(\lambda EX)$ に相当する。

【0023】この課題解決手段によれば、従来の光量子計法、標準光源(又は副標準光源)を利用した方法に比べて、従来は200~600nmまでの励起側・蛍光側のスペクトル補正しかできなかったものを200~900nmまでの励起側・蛍光側のスペクトル補正を可能にする。

【0024】第3の課題解決手段の作用…上記の第2の課題解決手段で求めたスペクトル補正関数 $G_{ex1}(\lambda EX)$ 、 $G_{em1}(\lambda EM)$ と $G_{ex2}(\lambda EX)$ 、 $G_{em2}(\lambda EM)$ をスペクトル測定に用いた波長に応じて記憶部から読み出すことで、自動的なスペクトルデータ処理により真のスペクトルを演算できる。

【0025】

【実施例】本発明の一実施例を図面にに基づき説明する。

【0026】図1は本発明のスペクトル補正の一例を示すフローチャート、図2はそのスペクトル補正に用いる

\*【0020】

【数3】 $\lambda 1$ について  $F_{ex1}(\lambda EX) \times F_{em1}(\lambda EM) = F1(\lambda EX, \lambda EM)$

$\lambda 2$ について  $F_{ex2}(\lambda EX) \times F_{em2}(\lambda EM) = F2(\lambda EX, \lambda EM)$

上記式から、工程二のように、既知データの $F1(\lambda EX, \lambda EM)$ と $F_{ex1}(\lambda EX)$ との比演算より第1の波長領域 $\lambda 1$ の蛍光側波長特性 $F_{em1}(\lambda EM)$ を求め、既知データの $F2(\lambda EX, \lambda EM)$ と $F_{em2}(\lambda EM)$ との比演算により第2の波長領域 $\lambda 2$ の励起側光学系の波長特性 $F_{ex2}(\lambda EX)$ とが求められる。

【0021】そして、以上の全ての波長特性が求まることで、第1の波長領域 $\lambda 1$ の励起側の補正関数 $G_{ex1}(\lambda EX)$ 、蛍光側の補正関数 $G_{em1}(\lambda EM)$ 及び第2の波長領域 $\lambda 2$ の励起側の補正関数 $G_{ex2}(\lambda EX)$ 、蛍光側の補正関数 $G_{em2}(\lambda EM)$ を次のようにして求めることができる。

【0022】

【数4】・ $\lambda 1$ について、

装置の波長特性を求めるための説明図、図3は図2に対応する波形説明図、図4は本発明の適用対象となる分光蛍光光度計の構成図である。

【0027】まず、図4により、分光蛍光光度計について説明する。

【0028】図4において、光源1から放射される光線は、励起側分光器2に入射する。励起側分光器2の設定波長は、パルスモータ3によって変えられる。パルスモータ3の動作は、コンピュータ4の中にあらかじめプログラムされており、インタフェース5を介して制御される。所期の励起波長を操作パネル6でキーインすることによって、励起側分光器2の波長が設定される。励起側分光器2によって取り出された単色光は、試料セル7内の測定試料8を照射し、試料8から放射された蛍光は蛍光側分光器9に入射する。蛍光側分光器9はパルスモータ10によって駆動されるが、その動作はパルスモータ3と同様に、コンピュータ4により制御される。蛍光側分光器9により選択された波長の蛍光は、検知器11に入射し、電気信号に変換される。その電気信号は、アナログ→デジタル変換器12によってデジタル信号に変えられる。一方、励起側分光器2から取り出された単色光の一部は、光源光量モニタのためビームスプリッタ13を介して、モニタ検知器14に入射し、電気信号に変換される。この電気信号も、アナログ→デジタル変換器12

によってデジタル信号に変えられる。検知器11からのデジタル信号(S)と、モニタ検知器14からのデジタル信号(M)は、コンピュータ4に送られ、比(S/M)が算出され、この比が各波長における蛍光強度として、コンピュータ4に記憶される。

【0029】コンピュータ4には、後述のロードミンBによる光量子計15(図2)を用いて求める第1の波長領域 $\lambda 1$ ( $\lambda 1$ は200~600nm)における励起側光学系の波長特性(励起側波長特性)、副標準光源(図3、標準光源により校正された2次ランプ)16を用いて求める第2の波長領域 $\lambda 2$ ( $\lambda 2$ は500~900nm)の蛍光側光学系の波長特性(蛍光側波長特性)、及びこれらの波長特性を利用して所定の関係式により第1の波長領域 $\lambda 1$ の蛍光側波長特性、第2の波長領域 $\lambda 2$ の励起側波長特性についてはスペクトル補正関数 $G_{ex1}(\lambda EX)$ 、 $G_{em1}(\lambda EM)$ 、 $G_{ex2}(\lambda EX)$ 、 $G_{em2}(\lambda EM)$ を求めるプログラムがコンピュータ4内に記憶されている。求められた各波長領域 $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ の励起側、蛍光側の波長特性及び補正関数は、コンピュータ4内のRAMに記憶され、未知試料の真のスペクトル測定、算出に使われる。

【0030】次に、装置の波長特性及びスペクトル補正関数を求める手順について、図1~図3を用いて説明する。

【0031】図1のステップS1~S4に示すように、波長特性及びスペクトル補正関数を求める手順は、4段階に大別される。

【0032】ステップS1では、ロードミンBを用いて第1の波長領域 $\lambda 1$ (本例では200~600nm)についての励起側波長特性を測定する。これに相当するのが図2の(a)で、ロードミンBを入れた三角セル(光量子計)15を試料セル位置にセットし、蛍光波長を640nmに固定しておく。このときに、励起側分光器2を波長走査して200~600nmについての励起スペクトルを測定すると、結果が図3(a)に示すような波長領域 $\lambda 1$ の励起側波長特性 $F_{ex1}(\lambda EX)$ となり、これをコンピュータ4に記憶する。

【0033】ステップS2では、副標準光源16により、第2の波長領域 $\lambda 2$ (本例では500~900nm)についての蛍光側波長特性を測定する。すなわち図2の(b)に示すように、副標準光源16から放射される光線を蛍光側分光器9に入射させる。蛍光側分光器9により500~900nmまで波長走査して蛍光スペクトルを測定すると、結果は、副標準光源16の波長特性 $F_c(\lambda EM)$ と蛍光側光学系の波長特性 $F_{em2}(\lambda EM)$ との積となる。ここで使用する副標準光源16

\*は、タングステンランプを用いたもので、その波長特性は2995°Kにおける黒体放射の式と一致することが確かめられているものである。このため、 $F_c(\lambda EM)$ は既知であり、比演算により図3の(b)に示すような $F_{em2}(\lambda EM)$ を求めることができ、これをコンピュータ4内に記憶する。

【0034】ステップS3では、全波長域 $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ について励起側、蛍光側両波長を、同一波長、同一速度で走査したスペクトルを測定する。すなわち図2の(c)に示すように、この場合には試料セル位置に拡散素子17をセットする。拡散素子17それ自体は波長依存性を持たないため、結果は次式に示すように励起側分光器2の波長特性と蛍光側分光器9の波長特性の積となる。この測定結果は図3の(c)に示す。

【0035】

【数5】 $\lambda 1 < 500 \text{ nm}$ について  $F_{ex1}(\lambda EX) \times F_{em1}(\lambda EM) = F1(\lambda EX, \lambda EM)$   
 $\lambda 2 > 500 \text{ nm}$ について  $F_{ex2}(\lambda EX) \times F_{em2}(\lambda EM) = F2(\lambda EX, \lambda EM)$   
 $\lambda EX = \lambda EM$

上記の内、 $F_{ex1}(\lambda EX)$ と $F_{em2}(\lambda EM)$ は前記の操作により既に求められているため、それらと $F1(\lambda EX, \lambda EM)$ 、 $F2(\lambda EX, \lambda EM)$ の比演算により $F_{em1}(\lambda EM)$ と $F_{ex2}(\lambda EX)$ を求める。

【0036】ステップ4では、以上の操作により求められた波長特性から、励起側、蛍光側各々の全波長域 $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ にわたるスペクトル補正関数 $G_{ex1}(\lambda EX)$ 、 $G_{em1}(\lambda EM)$ 及び $G_{ex2}(\lambda EX)$ 、 $G_{em2}(\lambda EM)$ を求める。

【0037】これらのスペクトル補正関数は、未知試料について測定した見かけのスペクトルに乗じることにより、真のスペクトルを求めるためのものである。蛍光光度計で得られたスペクトルは、縦軸が任意単位であり、ここで補正スペクトルと言っている意味は、強度について絶対単位を与えるものではなく、スペクトルの相対的な形状を補正するということである。しかし、補正後の値が補正前のものと大幅に違うことは好ましくないため、補正関数の値は1に近くなるように、適当な波長の値が1となるように規格化する。この場合には、500nmの値 $[F_{ex1}(500)$ 、 $F_{ex2}(500)$ 、 $F_{em1}(500)$ 、 $F_{em2}(500)]$ で各関数を規格化し、次の式により補正関数を算出する。

【0038】

【数6】・ $\lambda 1$ (500nm以下)について

$$G_{ex1}(\lambda EX) = F_{ex1}(500) / F_{ex1}(\lambda EX)$$

$$G_{em1}(\lambda EM) = F_{em1}(500) / F_{em1}(\lambda EM)$$

・ $\lambda 2$ (500nm以上)について

$$G_{ex2}(\lambda EX) = F_{ex2}(500) / F_{ex2}(\lambda EX)$$

11

12

$$Gem2(\lambda EM) = Fem2(500) / Fem2(\lambda EM)$$

以上のようにして求められたスペクトル補正関数は、コンピュータ4内に記憶される。

【0039】そしてステップ5にて未知試料測定後、次の式により補正スペクトルを求めるために使用される。

【0040】

【数7】・ $\lambda 1$ について  $Ic(\lambda EX, \lambda EM) = I(\lambda EX, \lambda EM) \times Gex1(\lambda EX) \times Gem1(\lambda EM)$

・ $\lambda 2$ について  $Ic(\lambda EX, \lambda EM) = I(\lambda EX, \lambda EM) \times Gex2(\lambda EX) \times Gem2(\lambda EM)$

上式で $Ic$ は補正スペクトル、 $I$ は補正前のスペクトルである。

【0041】本実施例によれば、励起側、蛍光側の双方の波長特性を200～900nmにわたり信頼性の高い方法により求め、これに基づく励起側及び蛍光側双方のスペクトル補正関数をそれぞれ波長領域200～500nmと500～900nmとの領域に分けてきめ細かく設定して蛍光スペクトル値を精度良く補正演算でき、しかも、コンピュータのデータ処理により真のスペクトルを自動的に求める効果がある。

【0042】

\*【発明の効果】以上のように本発明によれば、分光蛍光光度計の励起側、蛍光側における波長特性についてはそれに基づくスペクトル補正関数を従来以上に広く求めしかも信頼性の高い手法を用いて求めることができ、試料の測定レンジを高精度を保ちつつ広げることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のスペクトル補正の一例を示すフローチャート。

10 【図2】上記スペクトル補正に用いる装置の波長特性を求めるための説明図。

【図3】図2に対応する波形説明図。

【図4】本発明の適用対象となる分光蛍光光度計の構成図。

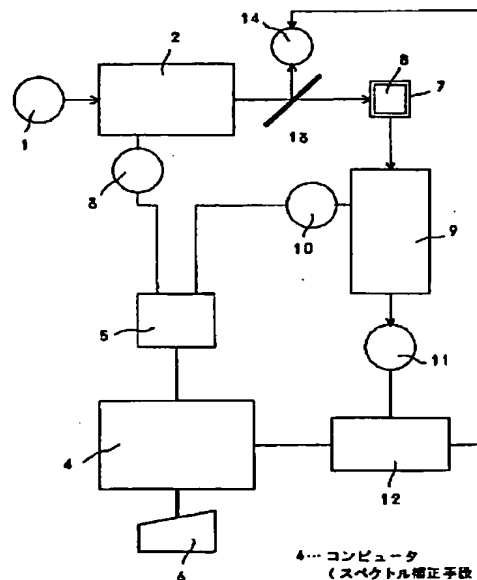
【符号の説明】

1…光源、2…励起側分光器、3…励起側パルスモータ、4…コンピュータ（スペクトル補正手段）、5…インターフェース、6…操作パネル、7…試料セル、8…測定試料、9…蛍光側分光器、10…蛍光側パルスモータ、11…検知器、12…A/D変換器、13…ビームスプリッタ、14…モニタ検知器、15…光量子計、16…副標準光源、17…拡散素子。

\*

【図4】

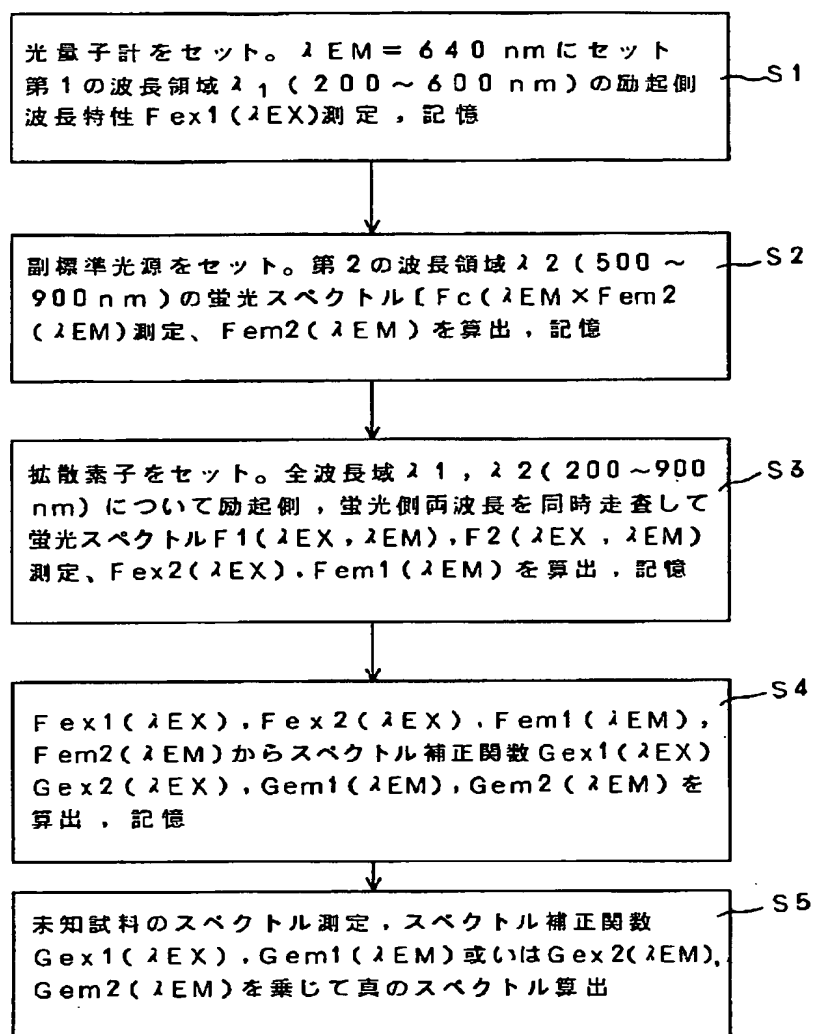
図 4





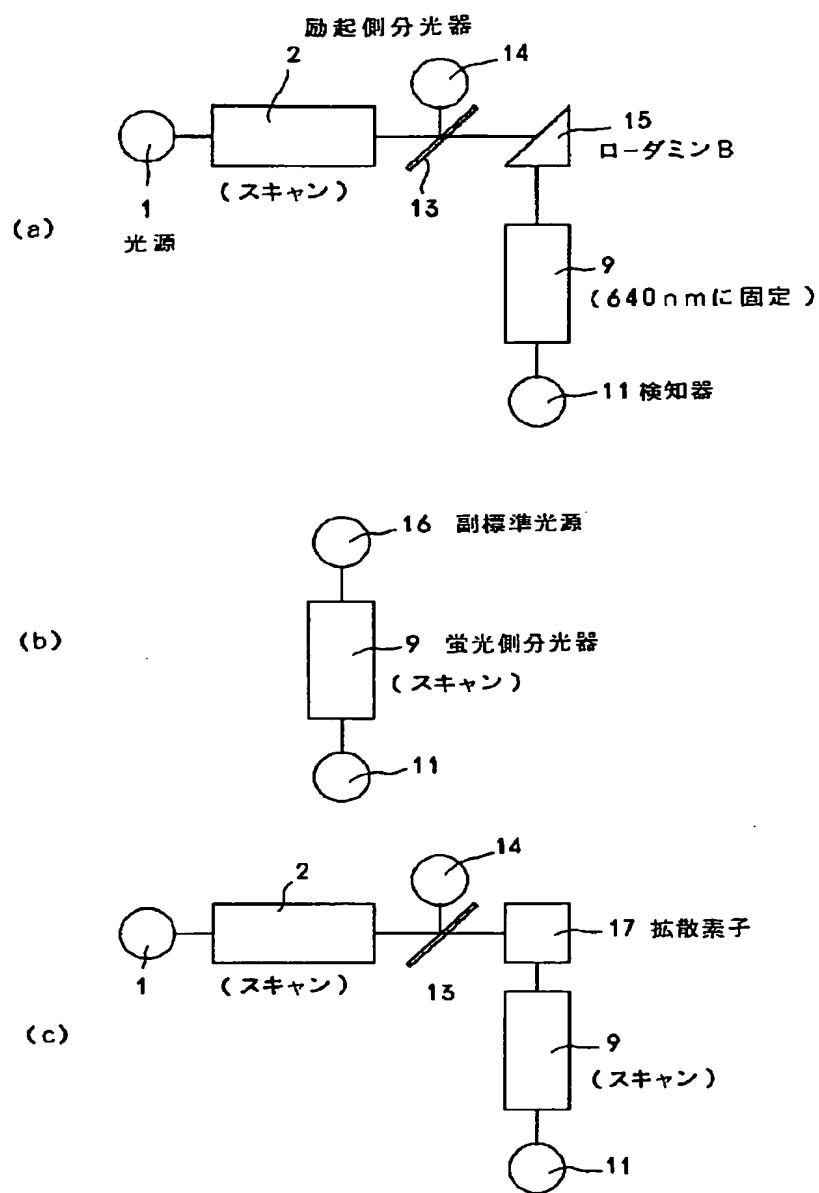
【図1】

図 1



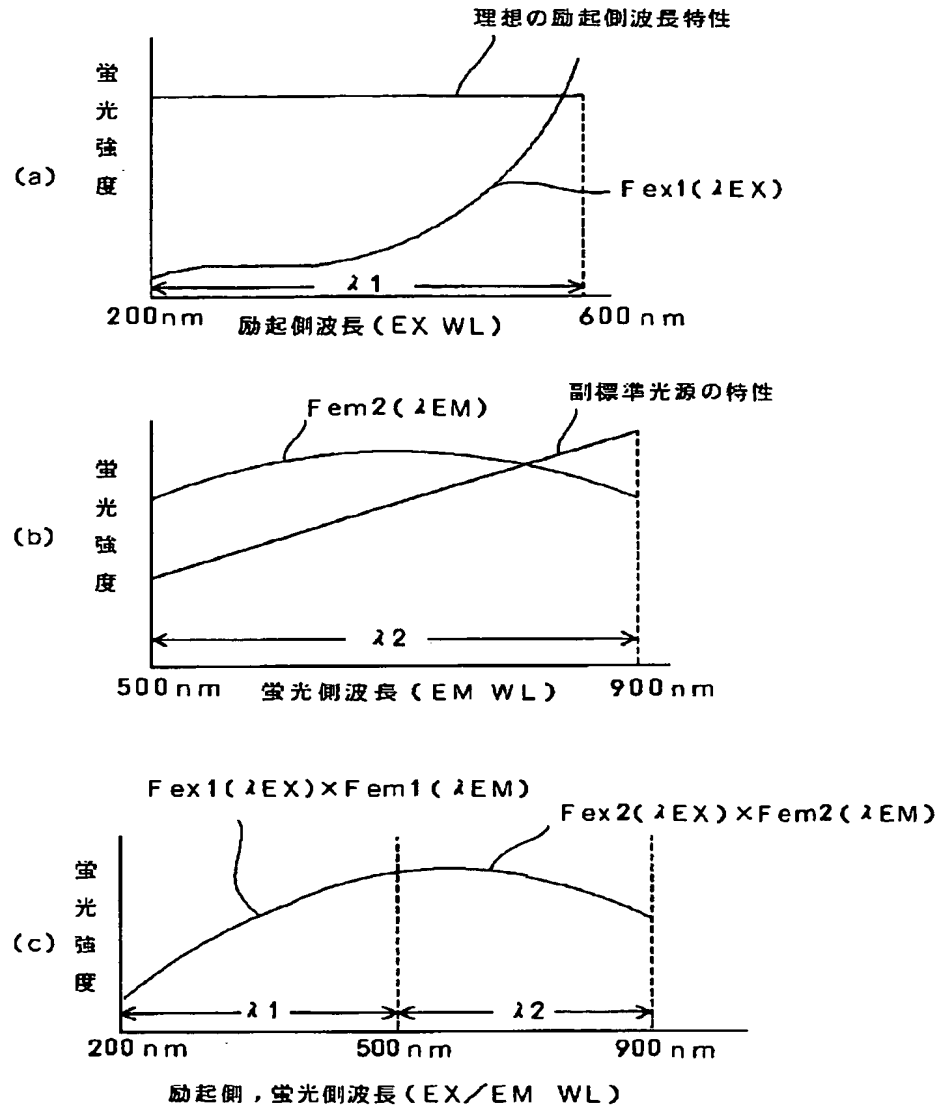
【図2】

図 2



【図3】

図 3



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成11年(1999)5月21日

【公開番号】特開平5-72039

【公開日】平成5年(1993)3月23日

【年通号数】公開特許公報5-721

【出願番号】特願平3-234705

【国際特許分類第6版】

G01J 3/443

G01N 21/64

【F I】

G01J 3/443

G01N 21/64 2

【手続補正書】

【提出日】平成10年1月26日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 光源、励起側分光器、蛍光側分光器、蛍光検知器、蛍光信号値から測定結果を算出する演算器を備えた分光蛍光光度計のスペクトル補正を行う場合に、所定の波長領域の蛍光側光学系の波長特性を求め、且つ前記所定の波長領域について前記励起側分光器、蛍光側分光器を用いて蛍光信号値を測定し、この測定された蛍光信号値と前記蛍光側光学系の波長特性とを用いて前記所定の波長領域における励起側光学系の波長特性を算出し、この励起側光学系の波長特性及び前記蛍光側光学系の波長特性に基づきスペクトル補正を行なうことを特徴とする分光蛍光光度計のスペクトル補正方法。

【請求項2】 前記所定の波長領域の蛍光側光学系の波長特性は、標準光源又は標準光源により校正された副標準光源を利用して求められ、前記所定の波長領域についての前記励起側分光器、蛍光側分光器を用いた蛍光信号値の測定は、これらの分光器を励起側、蛍光側の両波長を一致させながら同時走査して前記蛍光信号値となる蛍光スペクトルを測定することで行なわれ、

前記所定の波長領域の前記励起側光学系の波長特性の算出は、前記蛍光スペクトルの測定値と前記蛍光側光学系の波長特性との比演算により算出し、

前記スペクトル補正は、算出された前記励起側光学系の波長特性及び前記蛍光側光学系の波長特性に基づきスペクトル補正関数を定めて行なう請求項1記載の分光蛍光光度計のスペクトル補正方法。

【請求項3】 前記標準光源又は副標準光源としてタン

グステンランプを用い、前記所定の波長領域は600nmより長波長側の領域を含み、前記励起側、蛍光側の両波長を一致させながらの同時走査による蛍光スペクトル測定には光拡散素子を光路上にセットして行う請求項2記載の分光蛍光光度計のスペクトル補正方法。

【請求項4】 光源、励起側分光器、蛍光側分光器、蛍光検知器、蛍光信号値から測定結果を算出する演算器を備えた分光蛍光光度計のスペクトル補正を行う場合に、測定範囲の波長領域 $\lambda$ を第1波長領域 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ に分け、

第1の波長領域 $\lambda_1$ の励起側光学系の波長特性 $F_{ex1}(\lambda EX)$ を光量子計法により求める工程イ、

第2の波長領域 $\lambda_2$ の蛍光側光学系の波長特性 $F_{em2}(\lambda EM)$ を標準光源又は標準光源により校正された副標準光源を利用して求める工程ロ、

第1の波長領域 $\lambda_1$ 及び第2の波長領域 $\lambda_2$ の全波長領域について前記励起側分光器、蛍光側分光器により励起側、蛍光側の両波長を一致させながら同時走査して蛍光信号値を測定する工程ハ、

前記工程ハで測定された蛍光信号値のうち第1の波長領域 $\lambda_1$ に対応の測定値 $F_1(\lambda EX, \lambda EM)$ 、第2の波長領域 $\lambda_2$ に対応の測定値 $F_2(\lambda EX, \lambda EM)$ を分けて、測定値 $F_1(\lambda EX, \lambda EM)$ と前記工程イで求めた波長特性 $F_{ex1}(\lambda EX)$ との比演算より第1の波長領域 $\lambda_1$ の蛍光側光学系の波長特性 $F_{em1}(\lambda EM)$ を求め、一方、測定値 $F_2(\lambda EX, \lambda EM)$ と前記工程ロで求めた波長特性 $F_{em2}(\lambda EM)$ との比演算により第2の波長領域 $\lambda_2$ の励起側光学系の波長特性 $F_{ex2}(\lambda EX)$ とを求める工程ニ、

前記イ～ニの工程により求まる各波長特性より第1、第2の波長領域 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ ごとの励起側、蛍光側各々のスペクトル補正関数 $G_{ex1}(\lambda EX)$ 、 $G_{em1}(\lambda EM)$ と $G_{ex2}(\lambda EX)$ 、 $G_{em2}(\lambda EM)$ を求めることを特徴とする分光蛍光光度計のスペクトル補正方

法。

【請求項5】 前記工程イの光量子計の蛍光スクリーンとしてローダミンBを用い、前記工程ロの標準光源又は副標準光源としてタングステンランプを用い、前記第1の波長領域は600nm以下で200nm以上の範囲の中から設定し、前記第2の波長領域は、前記第1の波長領域以上で900nm以下の範囲を含むように設定した請求項4記載の分光蛍光光度計のスペクトル補正方法。

【請求項6】 前記工程ハでは光拡散素子を光路上にセットしてスペクトル測定を行う請求項4又は請求項5記載の分光蛍光光度計のスペクトル補正方法。

【請求項7】 光源、励起側分光器、蛍光側分光器、蛍光検知器、蛍光信号値から測定結果を算出する演算器を備えた分光蛍光光度計において、  
励起側光学系及び蛍光側光学系の波長特性に影響される見かけの蛍光スペクトル値を補正する手段を有し、このスペクトル補正手段は、測定範囲の波長領域 $\lambda$ を第1波長領域 $\lambda_1$ と第2の波長領域 $\lambda_2$ とに分けて、これらの波長領域 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ ごとに次の関係式で予め求めた補正関数 $G_{ex1}(\lambda EX)$ 、 $G_{em1}(\lambda EM)$ と $G_{ex2}(\lambda EX)$ 、 $G_{em2}(\lambda EM)$ を記憶し、

【数1】・ $\lambda_1$ について  $F_{ex1}(\lambda EX) \times F_{em1}(\lambda EM) = F_1(\lambda EX, \lambda EM)$

・ $\lambda_2$ について  $F_{ex2}(\lambda EX) \times F_{em2}(\lambda EM) = F_2(\lambda EX, \lambda EM)$

ここで、 $F_{ex1}(\lambda EX)$ ：光量子計法により求めた第1の波長領域 $\lambda_1$ の励起側光学系の波長特性

$F_1(\lambda EX, \lambda EM)$ ：第1の波長領域 $\lambda_1$ において励起側波長と蛍光側波長を一致させつつ励起側分光器及び蛍光側分光器を同時に波長走査して得られたスペクトル測定値

$F_{em1}(\lambda EM)$ ： $F_1(\lambda EX, \lambda EM)$ と $F_{ex1}(\lambda EX, \lambda EM)$ との比演算より得た第1の波長領域 $\lambda_1$ の蛍光側光学系の波長特性

$F_{em2}(\lambda EX)$ ：標準光源又は標準光源により校正された副標準光源を用いて求めた第2の波長領域 $\lambda_2$ の蛍光側光学系の波長特性

$F_2(\lambda EX, \lambda EM)$ ：第2の波長領域 $\lambda_2$ において励起側波長と蛍光側波長を一致させつつ励起側分光器及び蛍光側分光器を同時に波長走査して得られたスペクトル測定値

$F_{ex2}(\lambda EM)$ ： $F_2(\lambda EX, \lambda EM)$ と $F_{em2}(\lambda EX, \lambda EM)$ との比演算より得た第2波長領域 $\lambda_2$ の励起側光学系の波長特性

・ $\lambda_1$ について

$G_{ex1}(\lambda EX) = F_{ex1}(\lambda A) / F_{ex1}(\lambda EX)$

$G_{em1}(\lambda EM) = F_{em1}(\lambda A) / F_{em1}(\lambda EM)$

・ $\lambda_2$ について

$G_{ex2}(\lambda EX) = F_{ex2}(\lambda A) / F_{ex2}(\lambda EX)$

$G_{em2}(\lambda EM) = F_{em2}(\lambda A) / F_{em2}(\lambda EM)$

ここで、 $G_{ex1}(\lambda EX)$ ： $\lambda_1$ の励起側光学系の補正スペクトル関数

$G_{em1}(\lambda EM)$ ： $\lambda_1$ の蛍光側光学系の補正スペクトル関数

$G_{ex2}(\lambda EX)$ ： $\lambda_2$ の励起側光学系の補正スペクトル関数

$G_{em2}(\lambda EM)$ ： $\lambda_2$ の蛍光側光学系の補正スペクトル関数

$\lambda A$ ：スペクトルの相対的形狀を補正するために、見かけのスペクトル値のうちの一つを基準として適当に選んだもの

前記記憶した $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ のいずれかの補正スペクトル関数を実測される蛍光スペクトル値の測定波長領域 $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ に応じて読み出して見かけのスペクトル値の補正演算を行うよう設定したことを特徴とするスペクトル補正機能付き分光蛍光光度計。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【0010】本発明は以上の点に鑑みてなされ、その目的は、分光蛍光光度計において、前述したような励起側についても蛍光側と同様に例えば600nm以上の波長特性を高精度に求めて測定対象波長ひいては試料の測定レンジを広げることができるスペクトル補正技術を提供することにある。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正内容】

【0012】すなわち、光源、励起側分光器、蛍光側分光器、蛍光検知器、蛍光信号値から測定結果を算出する演算器を備えた分光蛍光光度計のスペクトル補正を行う場合に、所定の波長領域 $\lambda$ （例えば600nm以上或いはその近くの値以上の波長領域）の蛍光側光学系の波長特性 $F_{em}(\lambda EM)$ を求め、且つ前記所定の波長領域 $\lambda$ について前記励起側分光器、蛍光側分光器を用いて蛍光信号値 $F(\lambda EX, \lambda EM)$ を測定し、この測定された蛍光信号値 $F(\lambda EX, \lambda EM)$ と前記蛍光側光学系の波長特性 $F_{em}(\lambda EM)$ とを用いて、前記所定の波長領域 $\lambda$ における励起側光学系の波長特性 $F_{ex}(\lambda EX)$ を算出し、この励起側光学系の波長特性 $F_{ex}(\lambda EX)$ 及び前記蛍光側光学系の波長特性 $F_{em}(\lambda EM)$ に基づきスペクトル補正を行なうことを特徴とする

(これを第1の課題解決手段とする)。また、上記の具体的態様として、次のようなものを提案する。例えば、前記所定の波長領域 $\lambda$ の蛍光側光学系の波長特性 $F_{em}(\lambda EM)$ は、標準光源又は標準光源により校正された副標準光源を利用して求められ、前記所定の波長領域 $\lambda$ についての前記励起側分光器、蛍光側分光器を用いた蛍光信号値 $F(\lambda EX, \lambda EM)$ の測定は、これらの分光器を励起側、蛍光側の両波長を一致させながら同時走査して前記蛍光信号値となる蛍光スペクトルを測定することで行なわれ、前記所定の波長領域 $\lambda$ の前記励起側光学系の波長特性 $F_{ex}(\lambda EX)$ の算出は、前記蛍光スペクトルの測定値 $F(\lambda EX, \lambda EM)$ と前記蛍光側光学系の波長特性 $F_{em}(\lambda EM)$ との比演算により算出し、前記スペクトル補正は、算出された前記励起側光学系の波長特性 $F_{ex}(\lambda EX)$ 及び前記蛍光側光学系の波長特性 $F_{em}(\lambda EM)$ に基づきスペクトル補正関数を定めて行なう。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正内容】

【0016】

【作用】第1の課題解決手段の作用…所定の波長領域 $\lambda$ について前記励起側分光器、蛍光側分光器を用いて蛍光信号値 $F(\lambda EX, \lambda EM)$ を測定した場合、この蛍光信号値 $F(\lambda EX, \lambda EM)$ には、蛍光側光学系の波長特性 $F_{em}(\lambda EM)$ のほかに励起側光学系の波長特性 $F_{ex}(\lambda EX)$ が含まれ、これを式で表せば、次式で表される。

【数2】 $F_{ex}(\lambda EX) \times F_{em}(\lambda EM) = F(\lambda EX, \lambda EM)$

すなわち、 $F_{em}(\lambda EM)$ 及び $F(\lambda EX, \lambda EM)$ が既知であることから、上記式を成立させることで、波長領域 $\lambda$ における励起側波長特性 $F_{ex}(\lambda EX)$ を求めることができる。したがって、励起側光学系について波長領域 $\lambda$ における波長特性 $F_{ex}(\lambda EX)$ を求める場合に、励起側光学系だけで $F_{ex}(\lambda EX)$ を求めよ

うとしても信頼できる有効な方法が存在しない場合であっても、既知データである $F_{em}(\lambda EM)$ について高精度で求めることが可能であれば、上記の数2式を用いて励起側光学系の波長領域 $\lambda$ における波長特性 $F_{ex}(\lambda EX)$ を計算により高精度に算出することができる。次に上記の蛍光側光学系の波長特性 $F_{em}(\lambda EM)$ 、蛍光信号値 $F(\lambda EX, \lambda EM)$ 、励起側光学系の波長特性 $F_{ex}(\lambda EX)$ の求め方の具体的態様について説明する。標準光源又は副標準光源から放射される光を蛍光側光学系の分光器で所定の波長領域 $\lambda$ で走査しつつ蛍光検知器で測定すると、結果は、標準光源(副標準光源)の波長特性 $F_c(\lambda EM)$ と蛍光側光学系の波長特性 $F_{em}(\lambda EM)$ との積となり、 $F_c(\lambda EM)$ が既知であることから比演算により $F_{em}(\lambda EM)$ が求まる。また、前記所定の波長領域 $\lambda$ について励起側、蛍光側の両波長を一致させながら同時走査して得た蛍光スペクトル値を $F(\lambda EX, \lambda EM)$ とする。この蛍光スペクトル値 $F(\lambda EX, \lambda EM)$ には、既述のように蛍光側光学系の波長特性 $F_{em}(\lambda EM)$ のほかに励起側光学系の波長特性 $F_{ex}(\lambda EX)$ が含まれ、これを式で表せば、上記数2式となり、これにより、 $F_{ex}(\lambda EX)$ が算出される。この励起側光学系の波長特性及び前記蛍光側光学系の波長特性を利用することで、スペクトル補正が可能になる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正内容】

【0017】本具体的態様では、600nm以上で信頼できる標準光源又は副標準光源を用いる方法及び数2式を用いることで、従来、量子計法では測定できなかった600nm以上の励起側光学系の波長特性を知り、ひいてはこの600nm以上の励起側波長特性と蛍光側波長特性に基づき励起側、蛍光側の双方の補正関数 $G_{ex}(\lambda EX)$ 、 $G_{em}(\lambda EM)$ を求めることができる(通常、補正関数は波長特性の逆数で表される)。